Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln

Die Einwirkung von Pyridoxinhydrochlorid (Hexobion(R)) auf die Proliferation menschlichen Knochmarks in vitro

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ilona Klemm
aus Kappeln

1974

Aus der I. Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Berlin-Neukölln

Die Einwirkung von Pyridoxinhydrochlorid (Hexobion(R)) auf die Proliferation menschlichen Knochmarks in vitro

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ilona Klemm
aus Kappeln

Referent: Prof. Dr. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. H. Brücher

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 29. 11. 1974

UNIV. LEIDEN BIBL.

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 4, 1 Berlin 41

Meiner Mutter gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

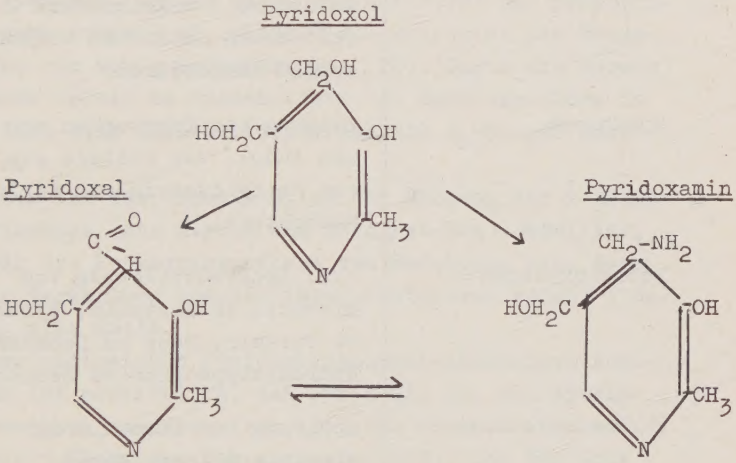
https://archive.org/details/IA41546521_0008

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung und Fragestellung	7
2.	Material und Methode	12
3.	Versuchsergebnisse	15
4.	Diskussion	41
5.	Zusammenfassung	44
6.	Literaturverzeichnis	45

Einleitung und Fragestellung

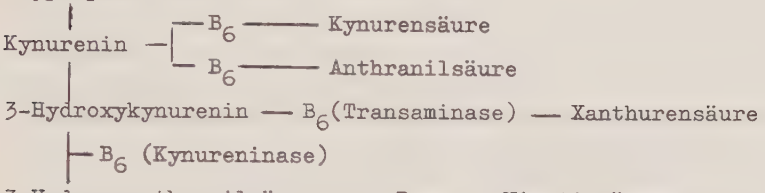
Im Jahre 1934 wurde das Vitamin B_6 von György entdeckt und erhielt nach seiner chemischen Struktur den Namen Pyridoxin. Er wird als Sammelbegriff gebraucht für drei chemisch nahe verwandte Substanzen, die durch Mikroorganismen und im tierischen Gewebe ineinander umgewandelt werden können:



Vitamin B_6 wird vor allem in Leber, Niere, Muskel und Gehirn gespeichert. Im Organismus wird das Pyridoxin in Pyridoxalphosphat umgewandelt, das als Cofaktor für eine ganze Reihe von Enzymen gebraucht wird, die in den gesamten nichtoxydativen Stoffwechsel der Aminosäuren eingreifen.
Die folgende Tabelle (14) zeigt enzymatische Reaktionen mit Pyridoxamin- und Pyridoxalphosphat als Cofaktoren.

Enzym	Reaktion
Diaminoxydase, Histaminase	Oxydation von Diaminen und Histamin
Serinhydroxymethyl-transferase	Bildung von 5,10-Methylentetra-hydrofolsäure
Glucanphosphorylase	Phosphorolyse von Glycogen
Transaminasen	Aminosäure 1 + Ketosäure 2 → Ketosäure 1 + Aminosäure 2 (mit allen natürlich vorkom-menden Aminosäuren)
Synthasen	Bildung von Tryptophan aus Serin und Indol, von Cystein aus Serin, von Methylcystein aus Serin und Methanthiol
Decarboxylasen	z.B. Decarboxylierung von Histidin zu Histamin, Tyrosin zu Tyramin, Dopa zu Dopamin, Hydroxytryptophan zu Serotonin
Threoninaldolase	Spaltung von Threonin in Glycin und Acetaldehyd
Dehydratasen	Desaminierung von Serin, Homoserin, Threonin usw.
Desulfhydrasen	Desaminierende Desulfhydrierung von Cystein und Homocystein
Racemasen	L-Aminosäure → D-Aminosäure (Alanin, Methionin, Glutamin-säure)

Im Tryptophanstoffwechsel sind mehrere Schritte Pyridoxalphosphat-abhängig:



Bei Vitamin-B_6-Mangel sinkt die Aktivität der Kynureninase sehr schnell ab, während die Aktivität der Transaminase nur wenig reduziert ist (28). Durch die daraus folgende vermehrte Ausscheidung von Xanthurensäure im Harn läßt sich leicht biochemisch ein B_6-Mangel nachweisen.

Außerdem ist das Vitamin B_6 an der Bildung der δ-Aminolävulinsäure (aus Glycin und Succinyl-CoA) beteiligt, die für die Porphyrinsynthese von Bedeutung ist. Auch in der Verwertung ungesättigter Fettsäuren spielt Vitamin B_6 eine Rolle.

Aus den zahlreichen Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktionen ist ersichtlich, daß Pyridoxin für den Eiweißstoffwechsel unentbehrlich ist. Das Minimum wird mit 1,5 bis 1,75 mg pro Tag angegeben (23). Der tägliche Bedarf variiert aber stark, da das Vitamin in umso größerer Menge benötigt wird, je umfangreicher das im Stoffwechsel zu bewältigende Eiweißangebot ist. In der Schwangerschaft ist der Bedarf erhöht, da der wachsende Foet das Vitamin aus dem mütterlichen Organismus bezieht (27). Ebenso wird bei Diabetes mellitus, nach länger andauernder Behandlung mit Isoniacid, bei Tumoren und bei fieberhaften Erkrankungen mit vermehrtem Eiweissumsatz mehr Vitamin B_6 benötigt.

Als Ursachen eines Vitamin-B_6-Mangels kommen in Betracht: Unzureichende Zufuhr des Vitamins mit der Nahrung, Störungen der Resorption, gesteigerter Bedarf oder Störungen der Verwertung im Organismus (z.B. durch Behandlung mit Isoniacid). Als häufigste Ursache ist dabei eine Störung der Vitaminverwertung anzunehmen, die möglicherweise genetisch determiniert ist (13).

Folgen eines Pyridoxinmangels können sein:
Wachstumshemmung, Pellagra-ähnliche Dermatitis, epileptiforme Krämpfe und eine hyperchrome mikrozytäre Anämie.

Antivitaminwirkung haben:
Desoxypyridoxin, INH und Cycloserin (22).

Unter den klinischen Symptomen eines Vitamin-B_6-Mangels stehen Funktionsstörungen des Zentralnervensystems im Vordergrund. Coursin (7) beschreibt Übererregbarkeit, Krämpfe und EEG-Veränderungen bei Kindern, die mit einem fast Vitamin-B_6-freien Milchpräparat ernährt wurden. Die Ursache dieser Störungen könnte eine Konzentrationsänderung der neuroregulatorischen Substanz γ-Aminobuttersäure sein, die durch die Veränderung der Aktivität Vitamin-B_6-abhängiger Enzyme bedingt ist (20).

Bei Kindern wurde eine hyprochrome mikrozytäre Anämie mit hohen Serumeisenwerten und normoblastischer Hyperplasie des Knochenmarkes gefunden, die den bekannten Hämatopoetika gegenüber refraktär war und auf Vitamin-B_6-Gaben mit einer Retikulozytenkrise und einer Normalisierung der Blutwerte reagierte. Granulopoese und Thrombopoese blieben unverändert (10, 12). Da Vitamin B_6 an der enzymatisch gesteuerten Bildung von Protoporphyrin beteiligt ist, geht bei Vitamin-B_6-Mangel die Fähigkeit der Erythroblasten verloren, Hämmoleküle aufzubauen; d.h. das im Blut zirkulierende Eisen kann nicht

eingebaut werden, weil kein Eisenrezeptor vorhanden ist (11). Es kommt daher zu den oben beschriebenen Zeichen einer Pyridoxinmangelanämie, die nach Heilmeyer zu den symptomatisch sideroachrestischen Anämien gezählt wird.

Stepantschitz und Schreiner beobachteten eine günstige Beeinflussung von hyperchromen postgrippalen Anämien und von Anämien nach zerebralen Erkrankungen (otogener Meningitis und Commotio cerebri) durch Vitamin B_6.
Böhnel empfielt die B_6-Therapie bei medikamentös-, zytostatisch- oder strahlenbedingten Leukopenien.
Döllken beschreibt Blutungsanämien bei Tieren, die durch B_6-Gaben geheilt werden konnten.

Über die direkte Einwirkung von Pyridoxin auf menschliches Knochenmark ist unseres Wissens noch nichts berichtet worden. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Pyridoxin eine Änderung der Proliferation in vitro bewirkt, was aufgrund seiner wichtigen Stellung im Eiweißstoffwechsel - insbesondere seiner Beteiligung an der Hämsynthese - möglich erscheint.

Material und Methode

Ein Teil der bei Sternalpunktionen aspirierten Markbröckchen wird auf einem Objektträger ausgestrichen und nach Pappenheim gefärbt. Der andere Teil wird zur Anlage von Knochenmarkkulturen nach der Carrelschen Deckglasmethode - modifiziert von Boll - verwendet: Das Knochenmark wird auf ein Coagulum, das zu 50 % aus Plasma des betreffenden Patienten, zu 40 % aus Serum und zu 10 % aus dreifach verstärktem Corhormon(R) besteht, aufgesetzt und mit einem Tropfen Serum bedeckt. Dem Medium ist bei der Hälfte der Kulturen Pyridoxinhydrochlorid in einer Endkonzentration von 50 γ/ml zugesetzt. Kristallisiertes Pyridoxinhydrochlorid wird unter dem Namen Hexobion(R) von der Firma Merck hergestellt. Die Versuchskonzentration von 50 γ/ml entspricht einer therapeutischen Dosis von 2 Ampullen Hexobion(R) (= 200 mg) pro Tag. Die Kulturen werden mit einem Hohlschliffobjektträger bedeckt, luftdicht verschlossen und umgedreht. Die so entstandenen Kulturen am hängenden Tropfen werden dann im Brutschrank bei 37°C inkubiert und nach 24, 48 und 72 Std. ausgestrichen, nach Pappenheim gefärbt und meanderförmig ausgezählt.

Die Zellen der Erythropoese wurden nach Boll differenziert in:

Proerythroblasten (PE)
basophile Erythroblasten (bE)
polychromatische Erythroblasten (pE)
oxyphile Erythroblasten (oE)
reife Erythroblasten (rE)

Außer den reifen Erythroblasten sind alle Zellen der Erythropoese teilungsfähig.

Die Granulopoese setzt sich zusammen aus:

Myeloblasten (Mb)
Promyelozyten (PMy)
neutrophilen Myelozyten (My)
basophilen Myelozyten (My)
eosinophilen Myelozyten (My)
Metamyelozyten (MMy)
stabkernigen Granulozyten (Stab)
neutrophilen segmentkernigen Granulozyten (Seg)
basophilen segmentkernigen Granulozyten (Seg)
eosinophilen segmentkernigen Granulozyten (Seg)

Die Zellen der weißen Reihe sind bis einschließlich der Metamyelozyten teilungsfähig. Die Zelldifferenzierung erfolgte nach den von Boll (5, 6) beschriebenen Kriterien.

Der besseren Übersichtlichkeit wegen sind in den Zeichnungen die neutrophilen, basophilen und eosinophilen Myelozyten zusammengefaßt, ebenso die segmentkernigen Granulozyten.

Die Mitosephasen wurden nach Boll unterschieden in:

Prophase (P): Aufgelöste Kernmembran und Nukleolus, festes Spirem.

frühe Metaphase (fM): Chromosomen über die Zelle ungeordnet verteilt, lockeres Spirem.

späte Metaphase (sM): Ordnung der Chromosomen zum Monaster, in gedrehter Ansicht: Äquatorialplatte.

Anaphase (A): Verdoppelung der Chromosomen als Diaster ersichtlich.

Telophase (T): Taillenbildung der Zelle, lockeres Dispirem.

Rekonstruktionsphase (R): zwei spiegelbildlich gleiche Tochterzellen, die meist durch einen Plasmafaden verbunden sind, festes Dispirem, noch keine Kernmembranen und Nukleoli.

Für jede der fünf untersuchten Knochenmarkproben wurden Reifungskurven aufgestellt, die die prozentuale Zellverteilung in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit darstellen. In den Abbildungen 1 - 6 sind die verschiedenen Zellfraktionen auf der Abszisse additiv zu 100 % aufgetragen. Auf der Ordinate sind die drei Kulturtage eingeteilt.

Außerdem sind die Zählergebnisse in karyologischen Kurven, Mitoseindices und G/E-Indices dargestellt.

Die Kontrollkulturen sind in den Abbildungen durch einen ausgezogenen Strich, die Kulturen mit Zusatz von Pyridoxinhydrochlorid durch einen unterbrochenen Strich gekennzeichnet. Der Mitoseindex gibt das Verhältnis der ausgezählten Mitosen zur Zahl der teilungsfähigen Zellen in Promille an, der G/E-Index das Verhältnis von Granulopoese zu Erythropoese.

Signifikanzberechnungen wurden nach dem χ^2-Verfahren durchgeführt.

Versuchsergebnisse

Von folgenden Patienten stand Sternalmark für die Versuchsreihe zur Verfügung:

Versuch 1

Bei der Knochenmarkspenderin Hedwig P., 87 Jahre, ist eine therapeutisch gut beeinflußbare hepatogene Anämie, eine Myodegeneratio cordis und eine allgemeine Arteriosklerose bekannt.

Laborwerte:	Hb	=	12 g%
	E	=	3,7 Mill./mm^3
	Hb/E	=	32,2 pg
	Leuko	=	5600/mm^3
	BSG	=	50/80
	Stab	=	2 %
	Seg	=	68 %
	Ly	=	26 %
	Mo	=	4 %
Medikamente:	2 X 1 Tbl. Lanicor(R)		
	3 X 1 Tbl. Enzynorm(R)		

Knochenmarkbefund: normale Zellverteilung, Anisozytose.

Kulturergebnisse (Abb. 1):

Erythropoese: Nach 24 Stunden ist die Ausreifung der Kulturen mit Vitamin B_6-Zusatz gegenüber den Kontrollkulturen etwas verlangsamt, nimmt dann aber rascher zu und stimmt nach 72 Stunden wieder etwa mit der der Kontrollen überein. Die Mitoseindices weichen nicht wesentlich voneinander ab.

Granulopoese: Bei den Promyelozyten zeigt sich mit Zusatz durchweg eine etwas schnellere Verminderung. Alle anderen Zellarten sind mit Zusatz nach 24 Std. etwas vermehrt, nach 48 und 72 Stunden jedoch überholen die Zusatzkulturen die Kontrollen in der Reifung. Mitose- und G/E-Indices zeigen keine wesentlichen Änderungen durch den Zusatz.

Versuch 1

Prozentuale Zellverteilung der Erythropoese:

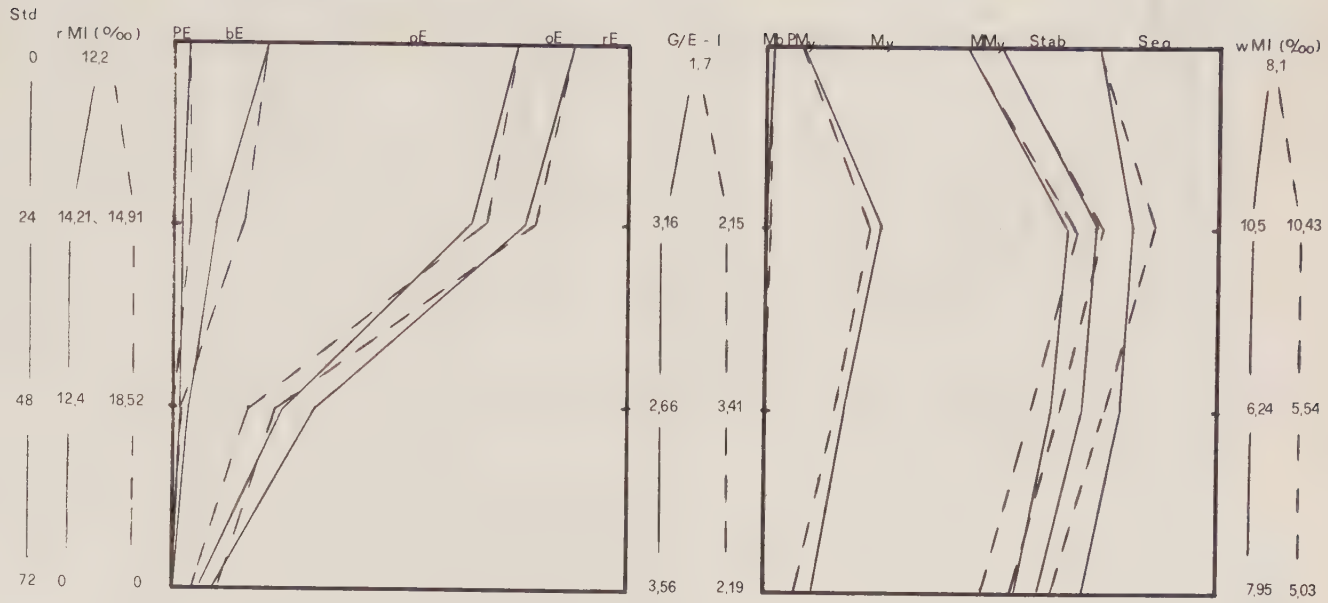
	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
PE	3,6	1,8	4,4	1,9	0,5	---	0,4
bE	17,6	7,8	11,0	1,2	0,7	0,5	0,4
pE	54,4	55,6	52,8	20,8	15,1	5,2	3,2
oE	12,0	11,8	10,7	7,2	6,0	2,2	6,0
rE	12,4	23,0	21,1	68,9	77,7	92,1	90,0

Prozentuale Zellverteilung der Granulopoese:

	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
Mb	1,4	0,6	1,6	0,7	0,4	0,1	---
PM	6,9	25,2	21,5	17,2	14,8	11,1	6,4
My	36,6	39,4	44,9	44,6	43,3	44,6	41,5
MMy	7,4	7,9	6,9	7,5	6,8	5,4	7,0
Stab	21,6	8,7	10,9	8,0	10,0	9,0	8,6
Seg	26,1	18,2	14,2	22,0	24,7	29,8	36,5

"Z" bedeutet Zusatz von 50 γ Pyridoxinhydrochlorid/ml.

VERSUCH 1 (hepatogene Anaemie)



ERYTHROPOESE

GRANULOPOESE

Zeichenerklärung S. 14

Abb. 1

Versuch 2

Die Knochenmarkspenderin Gerda M., 51 Jahre, wurde mit einem Harnstoffwert von 371 mg% bewußtlos aufgenommen. Diagnose: Urämie bei dringendem Verdacht auf Phenacetinniere und renale Anämie.

Laborwerte:

Hb	=	5,4 g%
Ery	=	1,55 Mill./mm^3
Hb/E	=	34,7 pg
Leuko	=	4400/mm^3
Thromb	=	72000/mm^3
eos.My	=	2 %
Stab	=	6 %
Seg	=	72 %
Lym	=	14 %
Mo	=	6 %

Medikamente: 3 X 1 gr. Binotal(R)
3 X 0,3 mg Encordin(R)

Knochenmarkbefund: vermehrte Erythropoese, atypische Plasmazellen.

Kulturergebnisse (Abb. 2):

Erythropoese: Nach 24 Stunden zeigt sich bei den Zusatzkulturen eine leichte Rechtsverschiebung, die nach 48 Stunden nur noch angedeutet ist. Danach reifen die Zellen mit Hexobionzusatz sogar etwas schneller aus als die Kontrollen.
Die Mitoseindices sind unverändert.

Granulopoese: Es zeigt sich im ganzen eine geringe Verlangsamung der Reifung, nach 24 Stunden vor allem auf Kosten der stabkernigen Granulozyten. Die Mitose- und G/E-Indices zeigen keine Veränderung durch den Zusatz.

Versuch 2

Prozentuale Zellverteilung der Erythropoese:

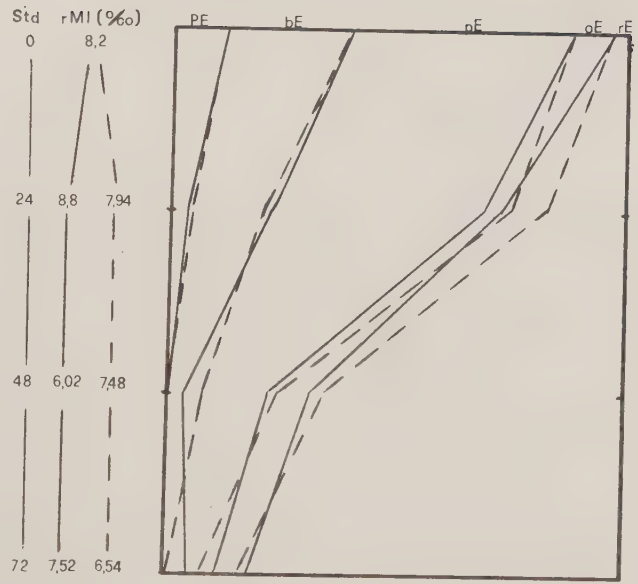
	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
PE	11,5	3,5	4,6	0,9	0,3	0,4	---
bE	27,3	18,6	16,5	2,3	7,3	3,8	0,9
pE	49,2	46,5	53,6	19,0	16,7	7,0	7,5
oE	9,3	4,1	9,0	9,0	10,6	6,9	8,2
rE	2,7	27,3	16,6	68,8	65,1	81,9	83,6

Prozentuale Zellverteilung der Granulopoese:

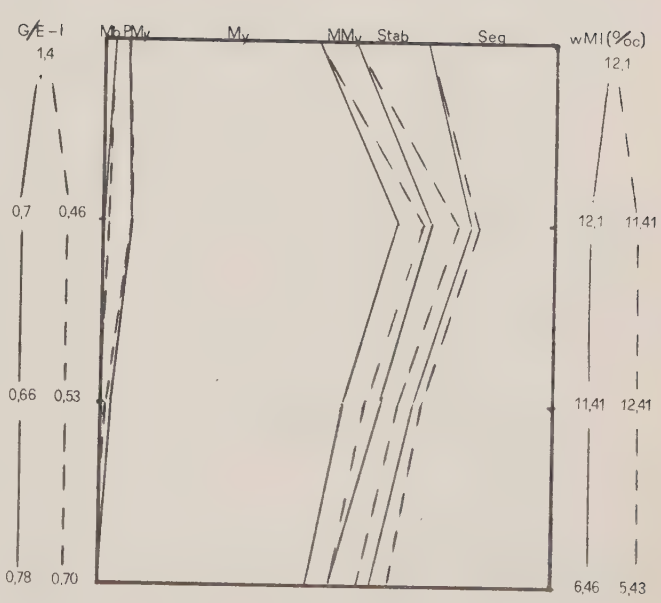
	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
Mb	2,6	0,5	1,4	1,7	0,3	---	---
PMy	3,1	6,2	5,6	1,1	1,0	---	0,6
My	41,7	58,5	64,0	50,2	57,5	50,3	50,3
MMy	9,2	7,9	7,5	9,1	7,6	8,9	5,5
Stab	14,9	8,1	4,4	6,3	4,6	4,1	6,7
Seg	28,5	18,8	17,1	31,6	29,0	36,7	36,9

"Z" bedeutet Zusatz von 50 γ Pyridoxinhydrochlorid/ml.

VERSUCH 2 (nephrogene Anaemie)



ERYTHROPOESE



GRANULOPOESE

Zeichenerklärung S. 14

Abb. 2

Versuch 3

Die Knochenmarkspenderin Ingeborg R., 55 Jahre, litt an einer cardialen Dekompensation. Sie wurde wegen eines Kontrastmittelzwischenfalles beim Galleröntgen aufgenommen.

Laborwerte:

SGOT	=	25 mU/ml
SGPT	=	15 mU/ml
BSG	=	30/54
eos.My	=	1 %
Stab	=	2 %
Seg	=	70 %
Lym	=	24 %
Mo	=	3 %
Thrombo	=	221000/mm^3
Hypergammaglobulinämie		
Hb	=	15,4 g%
Ery	=	8 Mill./mm^3
Hb/E	=	31,8 pg
Leuko	=	7800/mm^3

Medikamente: 2 X 1 mg Novodigal(R)
40 mg Lasix(R)
4 X 1 Drg. Tanderil(R)

Knochenmarkbefund: vermehrt Lymphozyten und Plasmazellen, auch atypische Plasmazellen.

Kulturergebnisse (Abb. 3):

Erythropoese: Bei den Zusatzkulturen zeigt sich eine leichte Rechtsverschiebung, die sich bis zu 48 Std. weiter ausprägt. Nach 72 Stunden haben aber beide Kurven eine etwa gleiche Zellverteilung. Die Mitoseindices weichen geringfugig voneinander ab.

Granulopoese: Auch hier ist nach 24 Stunden Einwirkung von Hexobion(R) eine etwas stärkere Vermehrung der teilungsfähigen Zellen zu beobachten, die nach 48 Stunden bei den Myelozyten und nach 72 Stunden auch bei den übrigen Zellen wegfällt. Die Mitoseindices sind unverändert, die G/E-Indices bei den Zusatzkulturen nach 24 und 48 Stunden herabgesetzt, nach 72 Stunden heraufgesetzt.

Versuch 3

Prozentuale Zellverteilung der Erythropoese:

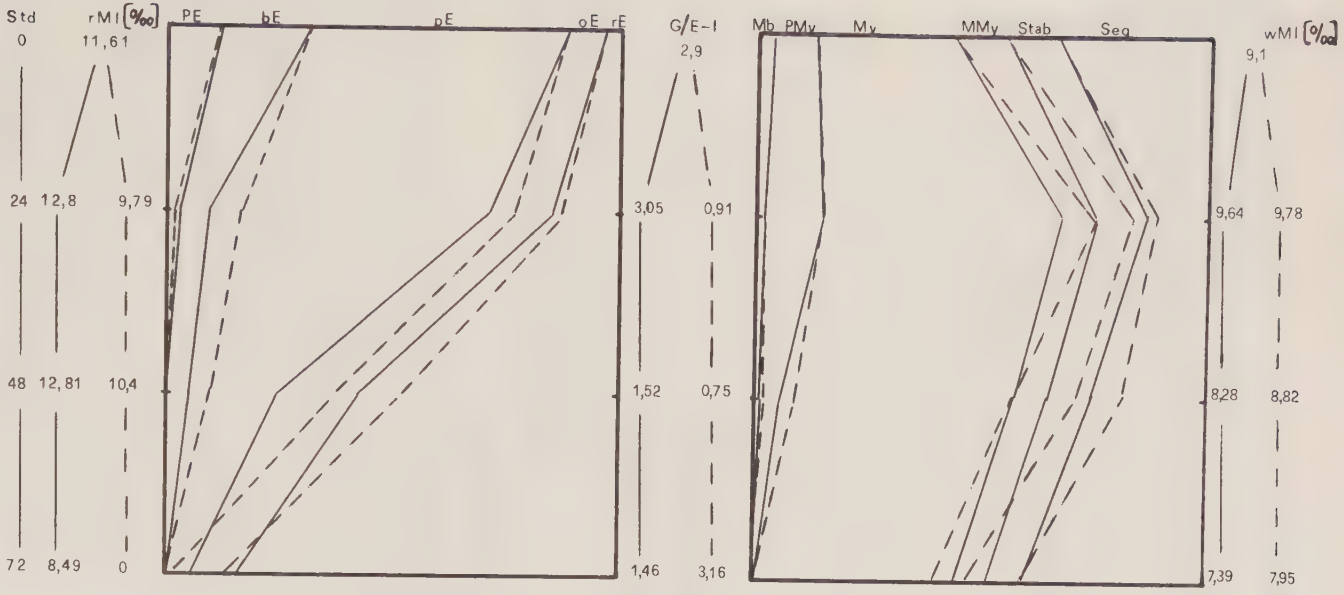
	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
PE	11,9	3,1	2,1	0,5	1,9	---	---
bE	19,5	6,3	15,1	4,9	8,7	0,6	---
pE	55,9	60,7	59,6	18,9	27,0	5,8	1,9
oE	8,9	14,1	10,2	18,1	14,6	10,0	11,1
rE	3,8	15,8	13,0	57,4	47,8	83,6	87,0

Prozentuale Zellverteilung der Granulopoese:

	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
Mb	2,9	1,5	1,9	1,1	2,7	---	---
PMy	9,4	12,9	12,4	4,6	7,6	0,9	0,8
My	32,5	53,2	61,3	51,0	52,3	44,7	37,4
MMy	10,9	7,2	8,3	8,1	8,6	5,6	8,6
Stab	11,5	10,5	4,0	9,5	9,6	7,0	12,7
Seg	32,8	14,7	12,1	25,7	19,2	41,8	40,5

"Z" bedeutet Zusatz mit 50 γ Pyridoxinhydrochlorid/ml.

VERSUCH 3 (cardiale Dekompensation)



ERYTHROPOESE

GRANULOPOESE

Abb. 3

Versuch 4
=========

Die Aufnahme der Knochenmarkspenderin Rosa B., 57 Jahre, erfolgte wegen häufiger Schwindelanfälle. Der im Coombstest (7-fach positiv !) nachgewiesene Autoantikörper erklärt die schon vorher bekannte hämolytische Anämie.

Laborwerte:		
	Ery	= 1,88 Mill./mm^3
	Hb	= 6,4 %
	Hb/E	= 34,2 pg
	Leuko	= 5600/mm^3
	Stab	= 2 %
	Seg	= 68 %
	Lym	= 26 %
	Mo	= 4 %
	BSG	= 36/64
	SGOT	= 29
	SGPT	= 25

Keine Medikamente

Knochenmarkbefund:

Auffällig ist die große Anzahl polychromatischer Erythroblasten und die Anisozytose. Außerdem sind die Lymphozyten vermehrt.

Kulturergebnisse:

Erythropoese: In der Kontrollkultur reifen die Erythroblasten in 24 Stunden nur mäßig, danach aber sehr schnell aus. Bei der Zusatzkultur ist es gerade umgekehrt: nach 24 Stunden ist eine ganz deutliche Zunahme der oxyphilen Erythroblasten zu erkennen. Nach 48 und 72 Stunden ist dann die Reifung weniger ausgeprägt als in der Kontrollkultur. Die Mitoseindices haben sich durch den Zusatz nicht verändert.

Granulopoese: Nach Hexobionzusatz zeigt sich durchweg eine Verschiebung zu Gunsten der unreifen Zellen. Die Mitoseindices sind erhöht, aber durch den Zusatz nicht verändert. Auch die G/E-Indices sind unverändert.

Versuch 4:

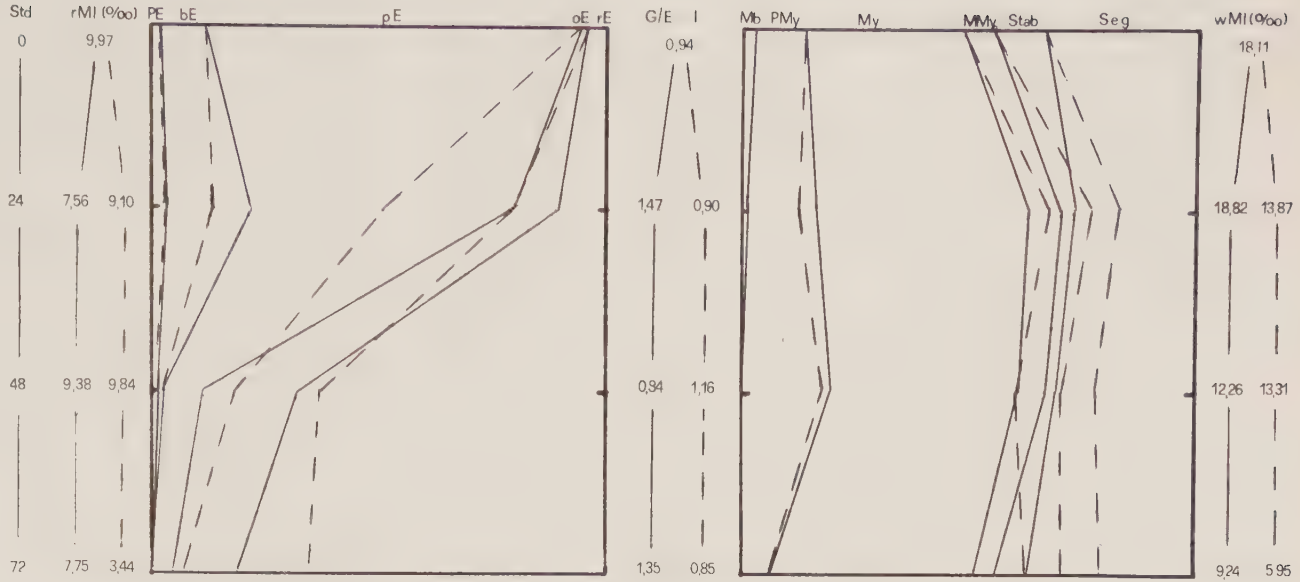
Prozentuale Zellverteilung der Erythropoese:

	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
PE	1,9	3,0	2,2	1,0	1,2	---	---
bE	9,4	18,3	10,0	0,8	1,2	0,3	0,4
pE	82,4	57,2	38,0	8,6	15,2	3,5	6,4
oE	1,3	10,2	29,2	20,8	19,0	14,1	27,6
rE	5,0	13,3	20,6	68,8	63,4	82,1	65,6

Prozentuale Zellverteilung der Granulopoese:

	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
Mb	2,2	0,5	0,5	0,2	0,2	---	---
PMy	11,2	15,0	11,6	19,7	17,2	6,0	5,0
My	37,0	47,4	56,1	40,5	42,7	45,1	57,0
MMy	5,1	7,1	8,1	5,9	10,0	4,7	8,3
Stab	11,2	3,0	6,0	2,3	7,5	6,4	8,3
Seg	33,3	27,0	17,7	31,4	22,4	37,8	21,4

VERSUCH 4 (haemolytische Anaemie)



ERYTHROPOESE

GRANULOPOESE

Abb. 4

Versuch 5
=========

Bei dem Knochenmarkspender Richard B., 59 Jahre, sind eine beiderseitige chronische Pyelonephritis und eine Eisenmangelanämie aufgrund häufiger Haemorrhoidalblutungen bekannt.

Laborwerte:

Hb	=	10,3 g%
Ery	=	3,92 Mill./mm^3
Hb/E	=	26,2 pg
BSG	=	36/71
Leuko	=	5600/mm^3
bas.My	=	1 %
eos.My	=	3 %
Stab	=	1 %
Seg	=	77 %
Lym	=	17 %
Mo	=	1 %

Eisenserumbestimmung = 37 γ %

Medikamente: 3 X 1/2 Tbl. Atropin sulfuric.
3 X 1 Eßl. Magnosil(R)

Knochenmarkbefund: Auffallend viele polychromatische Erythroblasten, Lymphozyten vermehrt, Anisozytose. Der G/E-Index ist für eine Blutungsanämie auffallend hoch; so muß eine aplastische Komponente, eventuell renal bedingt, mit im Spiel sein.

Kulturergebnisse (Abb. 5):

Erythropoese: Die Zellverteilungen sind dem 4. Versuch sehr ähnlich. Wieder fällt die erst schnellere, dann langsamere Ausreifung der Kultur mit Zusatz gegenüber der Kontrollkultur auf.
Die Mitoseindices sind in der Zusatzkultur unbedeutend erniedrigt.

Granulopoese: Durch den Zusatz sind die teilungsfähigen Zellen nach 24 Stunden vermindert, später vermehrt. Die Mitoseindices sind unverändert.
Die G/E-Indices sind insgesamt erhöht, aber durch den Zusatz nicht verändert.

Versuch 5

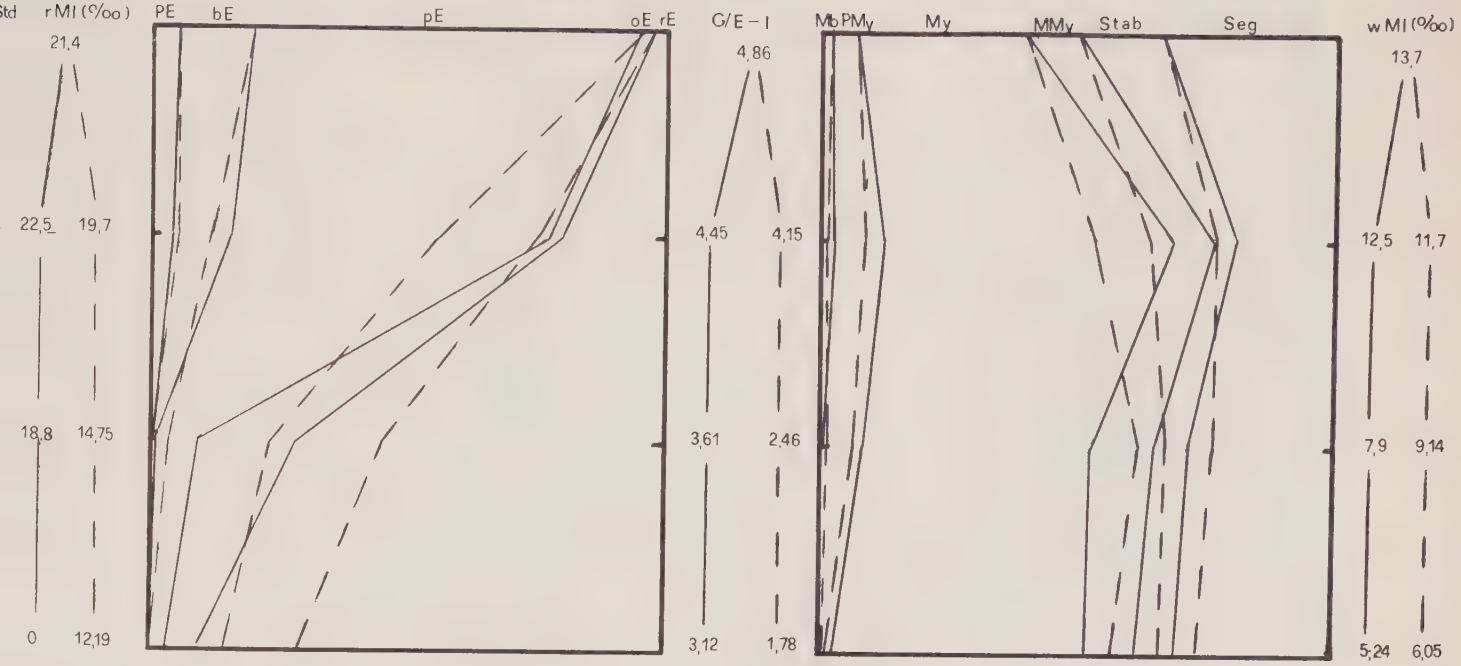
Prozentuale Zellverteilung der Erythropoese:

	0 H	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
PE	5,5	4,8	5,3	0,5	1,3	0,5	0,1
bE	14,4	10,4	5,9	0,5	2,6	0,5	0,3
pE	75,0	61,5	43,5	7,4	19,1	2,0	14,0
oE	2,4	2,8	20,0	19,6	21,0	6,0	14,0
rE	2,7	20,2	25,3	72,0	55,0	91,0	71,6

Prozentuale Zellverteilung der Granulopoese:

	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
Mb	1,2	2,0	1,0	0,7	1,4	0,1	0,2
PMy	5,2	10,0	6,7	7,5	4,1	1,2	0,7
My	35,2	58,0	45,5	45,4	55,9	49,7	55,8
MMy	8,9	6,5	7,2	11,0	5,4	10,4	8,9
Stab	16,6	4,0	17,0	6,6	9,4	7,6	8,2
Seg	32.9	19,5	22,6	28,8	23,8	31,0	26,2

VERSUCH 5 (Eisenmangelanaemie)



ERYTHROPOESE

GRANULOPOESE

Abb. 5

Für die Versuche 4 und 5 wurden Signifikanzberechnungen der Reifungskurven der Erythropoese und der Granulopoese nach dem χ^2-Verfahren durchgeführt.

χ^2-Werte, die bei 3 Freiheitsgraden über 11,5 , bei vier Freiheitsgraden über 13 und bei 5 Freiheitsgraden über 15 liegen, zeigen signifikante Abweichungen zwischen Kontrolle und Versuch an. Die dem χ^2-Wert entsprechende Wahrscheinlichkeit P wurde den Tabellen von Belitz entnommen. P ist dann signifikant, wenn es kleiner als 0,01 ist.

Versuch 4

Erythropoese:

Tabelle 4

24 h:	$\chi^2_4 = 150{,}38$	$P < 10^{-10}$
48 h:	$\chi^2_4 = 21{,}50$	$P = 0{,}00025$
72 h:	$\chi^2_3 = 53{,}63$	$P = 10^{-10}$

Im einzelnen setzen sich diese hoch signifikanten Abweichungen aus folgenden Signifikanzen (+) zusammen:

Tabelle 5

	24 h	48 h	72 h
PE			
bE	+		
pE	+	+	
oE	+		+
rE	+		+

Granulopoese:

Tabelle 6

24 h:	χ^2_5 = 51,81	P	= 10^{-9}
48 h:	χ^2_5 = 57,79	P	< 10^{-10}
72 h:	χ^2_4 = 61,26	P	< 10^{-10}

Die Signifikanzen betreffen:

Tabelle 7

	24 h	48 h	72 h
Mb			
PMy			
My			+
MMy			
Stab	(+)	+	
Seg	+	+	+

Versuch 5

Erythropoese:

Tabelle 8

24 h:	χ^2_4 =	30,62	$P < 10^{-5}$
48 h:	χ^2_4 =	39,06	$P < 10^{-7}$
72 h:	χ^2_4 =	63,76	$P < 10^{-10}$

Die Signifikanzen betreffen:

Tabelle 9

	24 h	48 h	72 h
PE			
bE			
pE		+	+
oE	+		+
rE		(+)	(+)

Granulopoese:

Tabelle 10

24 h:	χ^2_5 =	72,28	$P < 10^{-10}$
48 h:	χ^2_5 =	64,41	$P < 10^{-10}$
72 h:	χ^2_5 =	12,22	P = 0,03

Die Signifikanzen betreffen:

Tabelle 11

	24 h	48 h	72 h
Mb			
PMy		+	
My		+	
MMy		+	
Stab	+		
Seg			

Mitoseindex

Der Mitoseindex gibt das Verhältnis der ausgezählten Mitosen zur Gesamtzahl der teilungsfähigen Zellen in Promille an. Er ist also der Parameter nach dem die Regeneration beurteilt wird. Da für die statistische Beurteilung zu wenig Mitosen pro Stichprobe vorhanden sind - trotz 2000 gezählter Zellen pro Präparat in jedem Versuch - werden alle Versuche noch einmal gemeinsam betrachtet (Tab. 1, 2 und Abb. 6, 7).

Tabelle 1: Zusammenstellung der roten Mitoseindices

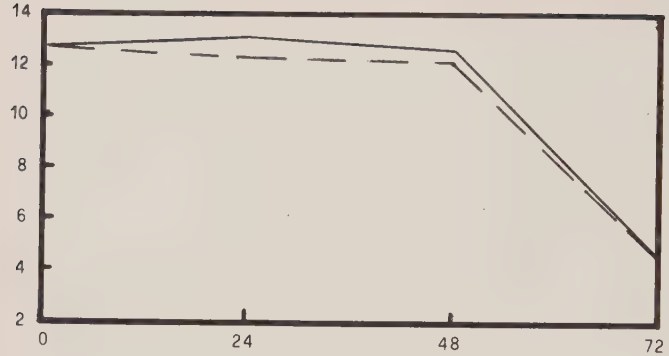
Versuch	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 hZ
1	12,2	14,21	14,91	12,4	18,52	---	---
2	8,2	8,8	7,94	6,02	7,48	7,52	6,54
3	11,61	12,8	9,79	12,81	10,4	8,49	---
4	9,97	7,56	9,10	9,38	9,84	7,75	3,44
5	21,4	22,5	19,7	18,8	14,75	---	12,19
arithmetisches Mittel	12,68	13,17	12,29	12,68	12,2	4,75	4,43

Tabelle 2: Zusammenstellung der weißen Mitoseindices

Versuch	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 hZ
1	8,1	10,5	10,43	6,24	5,54	7,95	5,03
2	12,1	12,1	11,41	11,41	12,41	6,46	5,43
3	9,1	9,64	9,78	8,28	8,82	7,39	7,95
4	18,11	18,8	13,87	12,26	13,31	9,24	5,93
5	13,7	12,5	11,7	7,9	9,14	5,24	6,05
arithmetisches Mittel	12,22	12,71	11,44	9,22	9,84	7,26	6,08

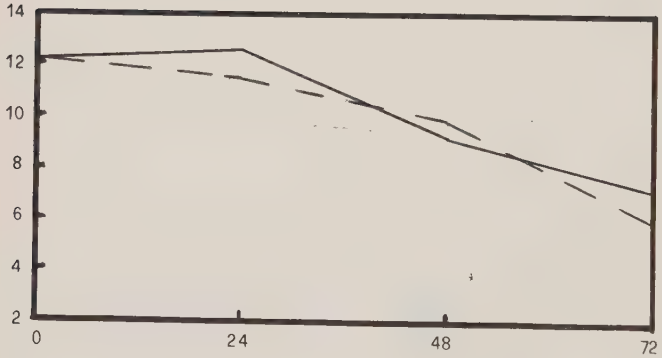
"Z" bedeutet Zusatz von 50 γ Pyridoxinhydrochlorid/ml.

MITTLERE MITOSEINDICES



ERYTHRO-
POESE

Abb. 6



GRANULO-
POESE

Abb. 7

MITTLERE G/E - INDICES

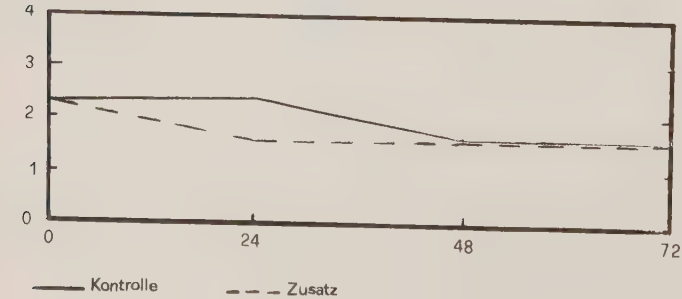


Abb. 8

G/E-Index (Abb. 8, Tab. 3)

Der G/E-Index gibt das Verhältnis aller Zellen der Granulopoese zu allen Zellen der Erythropoese wieder. In Abbildung 8 ist bis zu 24 Stunden eine geringe Entfernung der Mittelwertskurven voneinander zu erkennen, danach eine schnelle Annäherung. Der gesenkte 24 h-Wert ist ohne Bedeutung, da er vorwiegend durch das Ergebnis des Versuches 3 bedingt ist.

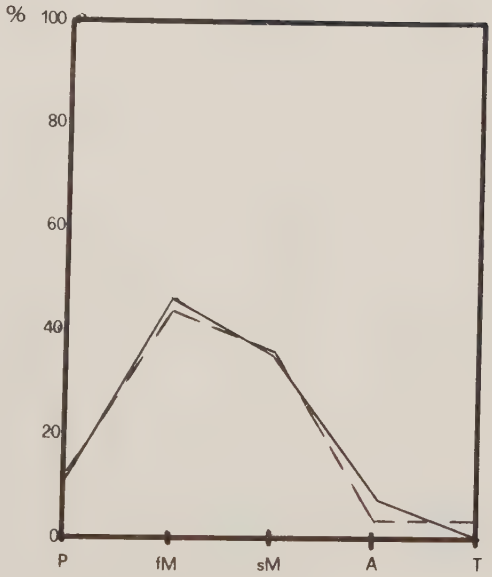
Tabelle 3: Zusammenstellung des G/E-Indices

Versuch	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
1	1,7	3,16	2,15	2,66	3,41	3,56	2,19
2	1,4	0,7	0,46	0,66	0,53	0,78	0,70
3	2,9	3,05	0,91	1,52	0,75	1,46	3,16
4	0,94	1,47	0,90	0,84	1,16	1,35	0,85
5	4,86	4,45	4,15	3,61	2,46	3,12	1,78
arithmetisches Mittel	2,36	2,57	1,71	1,86	1,66	1,87	1,74

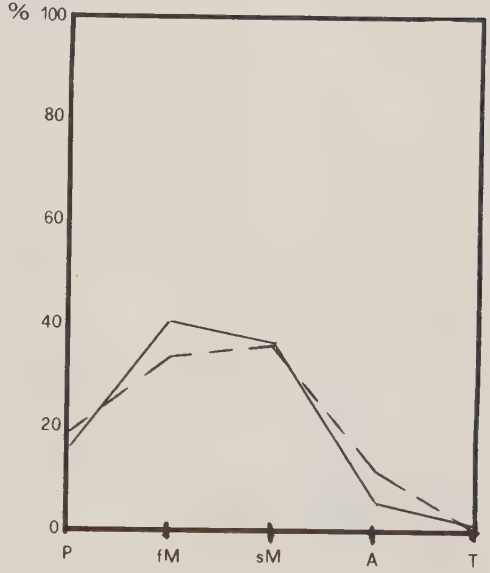
Die karyologischen Kurven (Abb. 9)

geben die prozentuale Verteilung der Mitosephasen wieder. In der Erythropoese liegen der Kontrollkurve 39 Mitosen zugrunde, der Versuchskurve 55.
In der Granulopoese sind 96 Mitosen für die Kontrollkurve und 90 Mitosen für die Versuchskurve gezählt worden. Während bei der Erythropoese die Gipfel beider Kurven übereinstimmen, liegt in der Granulopoese der Gipfel der Kontrollkurve bei den frühen Metaphasen und der der Versuchskurve bei den späten Metaphasen. Die Unterschiede sind nur gering.

ERYTHROPOESE



GRANULOPOESE



KARYOLOGISCHE KURVEN

Abb. 9

Mittelwertskurven (Abb. 10)

Aus den Reifungskurven der fünf untersuchten Fälle (insgesamt wurden 70 000 Zellen differenziert) wurde für die Erythropoese und für die Granulopoese je eine Mittelwertskurve aufgestellt, die graphisch folgende Prozentangaben wiedergibt:

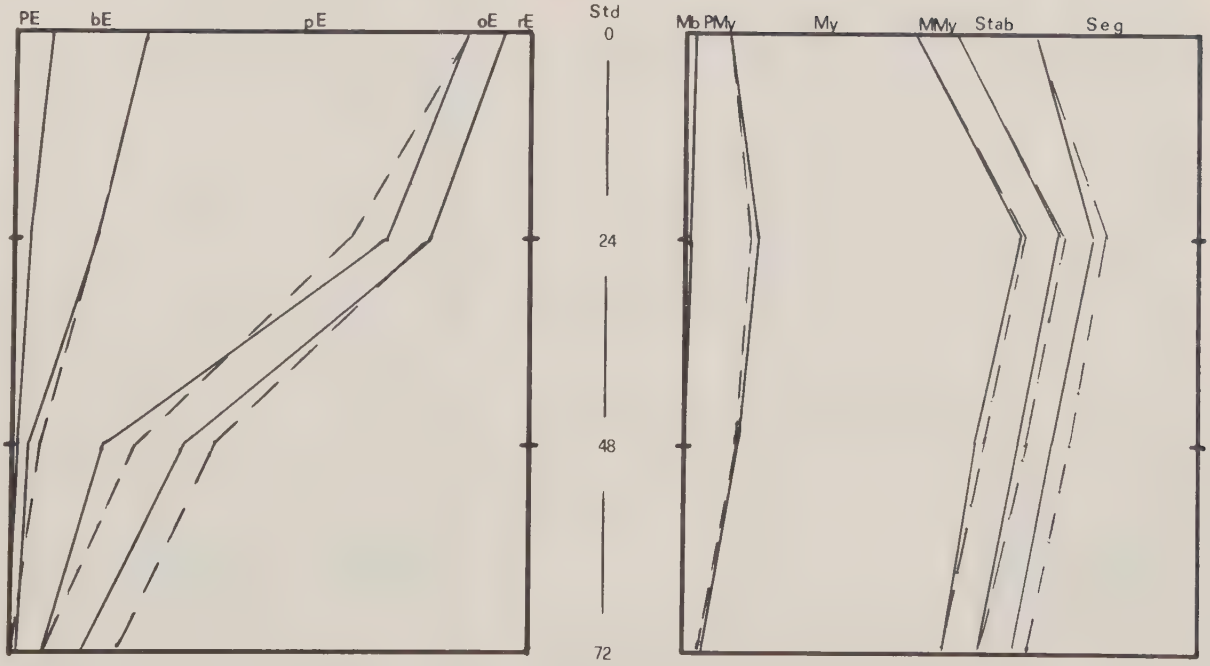
Erythropoese	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
PE	6,88	3,24	3,66	0,96	1,04	0,18	0,1
bE	17,64	12,28	11,7	1,94	4,1	1,14	0,4
pE	63,38	56,3	49,5	14,94	18,62	4,7	6,6
oE	6,78	8,6	15,82	14,94	14,26	7,84	13,38
rE	5,32	19,92	19,32	67,18	61,7	86,14	79,56

Granulopoese	0 h	24 h	24 h Z	48 h	48 h Z	72 h	72 h Z
Mb	2,06	1,04	1,28	0,48	1,0	0,04	0,04
PMy	7,16	13,89	11,56	10,02	8,94	3,84	2,70
My	36,61	51,30	54,36	46,34	50,20	46,84	48,41
MMy	8,3	7,32	7,6	8,32	7,68	7,0	7,66
Stab	15,16	6,88	8,46	6,54	8,22	6,82	8,9
Seg	30,72	19,66	16,74	27,92	23,82	35,44	32,30

Die Mittelwertskurve der Erythropoese zeigt nach 24 Stunden eine beschleunigte Ausreifung von polychromatischen zu orthochromatischen Erythroblasten, später eine verzögerte Ausreifung unter Hexobionzusatz. Diese Veränderungen entsprechen den Versuchen 4 und 5, während die Versuche 1 - 3 ein abweichendes Reifungsmuster aufweisen.

In der Granulopoese bewirkte der Zusatz nur eine geringe Veränderung der segmentkernigen Granulozyten. Die Reifungsverzögerung kommt auch in fast allen Einzelkurven (Abb.1 bis 5) zur Darstellung.

MITTELWERTSKURVEN



ERYTHROPOESE

GRANULOPOESE

Zeichenerklärung S. 14

Abb. 10

Diskussion

Vitamin B_6 ist als Pyridoxalphosphat an über vierzig enzymatisch gesteuerten Reaktionen beteiligt, die vor allem in den Eiweißstoffwechsel eingreifen. Vitamin B_6-Mangel wirkt sich besonders auf Haut, Nerven und Blut aus. Es werden Erfolge mit der B_6-Therapie bei sideroachrestischen Anämien von Patienten und bei Blutungsanämien von Versuchstieren beschrieben. Über den Wirkungsmechanismus des Vitamins auf die Proliferation des Knochenmarkes liegen noch keine Angaben vor. Da Pyridoxalphosphat als Coenzym auch an der Protoporphyrinsynthese beteiligt ist, scheint eine Beeinflussung der Proliferation der Erythropoese durch den Zusatz von Vitamin B_6 möglich.

Die Erythropoese muß für die Versuche 1 - 3 und 4 - 5 getrennt betrachtet werden. Bei den ersten drei Versuchen zeigen sich nur geringe Abweichungen beider Kurven. Dabei fällt in Versuch 1 eine schnelle Hämoglobinisierung nach 24 Stunden in der Zusatzkultur auf, während der Hämoglobineinbau bei den Versuchen 2 und 3 eher verzögert erscheint. Geringe Kurvenabweichungen können durch methodische Fehler in Ausstrich, Färbung und Zählung nur in Rand- oder Mittelfeldern bedingt sein. Durch meanderförmiges Auszählen soll der Fehler möglichst gering gehalten werden. Er läßt sich jedoch nicht ganz ausschließen, da z.B. Erythroblasten bevorzugt in Nestern beieinander liegen.

In den Versuchen 4 und 5 sieht man einen deutlich unterschiedlichen Verlauf von Versuchs- und Kontrollkurve. Die Ähnlichkeit beider Versuche fällt auf. In Versuch 4 ist bei hämolytischer Anämie die Erythropoese kompensatorisch stark gesteigert mit einem G/E-Index um 1.

In Versuch 5 ist im Gegensatz dazu der G/E-Index erhöht - trotzdem ist der Effekt durch Vitamin B_6 gleich.

Döllken erreichte nach einem Aderlaß bei Kaninchen durch Vitamin B_6 eine rasche und ausgiebige Vermehrung des Hämoglobins und der Erythrozyten. Er experimentierte mit der gleichen Konzentration Vitamin B_6 wie wir (ca. 3 mg/kg Körpergewicht). Ebenso hat Dann nachgewiesen, daß Pyridoxin eine blutregenerierende Wirkung hat.

In unseren Versuchen ist die Umwandlung von polychromatischen Erythroblasten zu orthochromatischen Erythroblasten, also die Hämoglobinisierung, in den ersten 24 Stunden signifikant beschleunigt. Die spätere Reifungsverzögerung könnte dadurch bedingt sein, daß das in dem geschlossenen Kultursystem vorhandene Pyridoxin verbraucht ist oder die nötigen Eiweißbausteine nicht mehr ausreichend nachgeliefert werden können. Es könnte auch sein, daß nur das zum Pyridoxalphosphat gehörige Apoenzym fehlt.

In der Granulopoese unterscheiden sich die beiden letzten Versuche. In den Kontrollkurven wird die Vermehrung der teilungsfähigen Vorstufen bis 24 Stunden später durch das Überwiegen der Reifung abgelöst. Versuch 5 zeigt nach der fehlenden Vermehrung der Vorstufen eine Verzögerung der Reifung mit Zusatz, Versuch 4 dagegen erst eine übermäßige Vermehrung der teilungsfähigen Zellen und dann ebenfalls eine Reifungsverzögerung. Aus Abbildung 10 wird deutlich, daß bei allen Versuchen eine geringe, aber signifikante Reifungsverzögerung durch den Zusatz eingetreten ist. In den Versuchen 2 - 4 sind die teilungsfähigen Vorstufen nach 24 Stunden vermehrt, was im Sinne einer Proliferationsanregung gedeutet werden könnte. Da aber

ein erhöhter weißer Mitoseindex fehlt, ist ein vermehrter Untergang von segmentkernigen Granulozyten wahrscheinlicher.

Die Regeneration - beurteilt anhand von Mitoseindices und karyologischen Kurven - zeigt keine eindeutige Veränderung durch den Zusatz.

Auch in den Kurven der G/E-Indices (Abbildung 8) kommt es zu keiner deutlichen Abweichung. Die G/E-Indices liegen normalerweise bei 3 bis 3,5. In unseren Versuchen sind sie meist erniedrigt, weil es sich um mehr oder weniger ausgeprägte Anämien handelt.

Abschließend läßt sich nur eine kurzfristig hochsignifikant beschleunigte Hämoglobinisierung in zwei Versuchen und eine etwas später einsetzende Hämoglobisierung in einem Versuch feststellen. Auf die Regeneration hat Vitamin B_6 keinen Einfluß. Die Granulopoese wird in der Reifung etwas gehemmt. Ob die Rechtsverschiebung der Kurven nach 24 Stunden als Proliferationsförderung gedeutet werden darf, muß fraglich bleiben, da die Regeneration nicht verändert und der G/E-Index sogar erniedrigt ist. Um eine sichere Aussage machen zu können, müßte eine größere Versuchsreihe nur mit Blutungs- bzw. hämolytischen Anämien angesetzt werden.

Zusammenfassung

Da Vitamin B_6 als Pyridoxalphosphat Coenzym von sehr vielen Enzymen ist, die in den gesamten Eiweißstoffwechsel eingreifen, und es unter anderem auch an der Hämsynthese beteiligt ist, wurde die Wirkung auf die Hämatopoese in Knochenmarkkulturen untersucht.

Eine Kultur, der 50 γ/ml Hexobion(R) zugesetzt war, wurde in 24-stündigen Abständen mit einer Kontrollkultur verglichen. Aus insgesamt 70 000 differenzierten Zellen von fünf Knochenmarkspendern wurden Reifungskurven und karyologische Kurven aufgestellt, Mitoseindices und G/E-Indices errechnet.

Die Auswertung der Erythropoese ergab eine hochsignifikant beschleunigte Hämoglobinisierung nach 24 Stunden bei zwei Versuchen und eine etwas später einsetzende Hämoglobinisierung bei einem Versuch.

In der Granulopoese wurde die Reifung etwas gehemmt.

Auf die Regeneration hat Vitamin B_6 keinen Einfluß.

Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Literaturverzeichnis

1. Aschkenasy, A. — Nutrition et Hématopoièse, Editions du centre national de la recherche scientifique, Paris (1971), 230, 452

2. Abderhalden, R. — Vitamine, Hormone, Fermente Benno Schwabe und Co. Verlag Basel (1953)

3. Belitz, H.J. — Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie Sonderdruck aus: Der Mathematikunterricht, Heft 3 (1960)

4. Böhnel, J. und Stacher, A. — Die Wirkung von Vitamin B_6 bei Leukopenien Medizinische Welt Nr.11(1963)589

5. Boll, I. — Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen Springer Verlag (1966)

6. Boll, I. und Mersch, G. — Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro, Blut 17 (1968), 193

7. Coursin, D.B. — Vitamin B_6 Metabolism in Infants and Children Vitamines and Hormones 22 (1964), 755

8. Dann, W.J. — The possible clinical significance of factors of the vitamin B_2complex other than nicotinic acid Kongr.Zbl.inn.Med.102 (1940), 64

9. Döllken, H. — Behandlung der Blutungsanämie bei Kaninchen. Klin.Wschr. 19 (1940) 220

10. Erslev, A.J. — Pyridoxinmangelanämie. New Engl.J.Med. 262 (1960) 1209

11. Fleischhacker, H. — Der Einfluß von Vitamin B_6 auf Sideroblastenanämie, B-Vitamine. Schattauer-Verlag, Stuttgart (1966) 361

12. Gehrmann, G. — Pyridoxinmangel-Anämie beim Menschen. Fol.haem., N.F., Bd.2 (1958) 225

13. Gehrmann, G. — Vitamin B_6 und Hämatopoese. Dt.med.Wschr. (1963) 226

14. Geigy, J.R. — Wissenschaftliche Tabellen. Basel (1955) 469

15. Gyorgy, P. — The history of vitamin B_6. Vitamines and Hormones 22 (1964) 361

16. Heilmeyer, L. — Grundriß der Pathophysiologie des Blutes. Gustav Fischer Verlg. Stuttg. (1968)

17. Kahn P. und Stacher, A. — Die sideroachrestischen Anämien und Vitamin B_6. Wien.klin.Wschr. 5 (1963) 80

18. Merck, E. — Wissenschaftliche Berichte Nr. 1 Vitamin B_6: Forschung-Klinik-Praxis (1960)

19. Rapoport, S.M. — Medizinische Biochemie. VEB Verlag, Volk u.Gesundheit Berlin (1969)

20. Roberts, E. und Wein, J. und Simonsen, D.G. — γ-Aminobutyric Acid, Vitamin B_6 and Neuronal Function - A Speculative Synthesis Vitamines and Hormones 22 (1964),503

21. Rohr, K. — Das menschliche Knochenmark Thieme Verlag Stuttgart (1960)

22. Rosen, F. Mihich, E. und Nichol, C.A. — Selective Metabolic and Chemotherapeutic Effects of Vitamin B_6 Antimetabolites Vitamines and Hormones 22 (1964),609

23. Sauberlich, H. — Human Requirements for Vitamin B_6 Vitamines and Hormones 22(1964),807

24. Snell, E. — Some Notes of the Metabolism of Vitamin B_6 Vitamines and Hormones 22(1064),485

25. Stepantschitz, G. — Über die Bedeutung des Vitamin B_6 bei der Blutbildung Wien.Zschr.inn.Med. 34 (1953), 105

26. Stepp, W. und Kühnau, J. — Die Vitamine und ihre klinische Anwendung F.Enke Verlag Stuttgart (1952)

27. Wachstein, M. — Evidence for a Relative Vitamin B_6 Deficiency in Pregnancy and some Deseases States Vitamines and Hormones 22(1964),705

28. Weber,F. und Wiss, O. — Veränderung von Enzymaktivitäten durch Vitamin-B_6-Mangel B-Vitamine,Schattauer Verlag Stuttgart (1966), 315

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Boll für die Überlassung des Themas und die ständige Hilfsbereitschaft bei der Abfassung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Belitz danke ich für die Hilfe bei den Signifikanzberechnungen.

Lebenslauf

Am 10. Februar 1948 wurde ich als Tochter des Seelotsen Johannes Klemm und seiner Frau Ursula, geb. Rickheim, in Kappeln geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Grundschule in Cuxhaven und anschließend den humanistischen Zweig der Kaiser-Karl-Schule in Itzehoe/Holstein, wo ich 1967 das Abitur bestand.

Im Wintersemester 1967 begann ich an der Freien Universität Berlin das Medizinstudium. 1968 habe ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1970 die ärztliche Vorprüfung hier abgelegt.
Am 7. März 1974 beendete ich das Studium an der Freien Universität Berlin mit dem medizinischen Staatsexamen.